



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Identification of EPLIN as a Crucial Regulator for Extrusion of RasV12-transformed Cells [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	大岡, 敦子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第11913号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58996
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Atsuko_Ohoka_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（理学）

氏名 大岡 敦子

学 位 論 文 題 名

Identification of EPLIN as a Crucial Regulator for Extrusion of RasV12-transformed Cells

(Ras 変異細胞の正常上皮細胞層からの逸脱における重要な制御因子としての EPLIN の同定)

[序論]

我々の体の中で起こるがんの80%以上は、肺・胃・大腸・乳腺などの上皮細胞由来のものである。また、臨床で検出されるがんの多くでは、複数の変異ががん遺伝子やがん抑制遺伝子に起こっていることが知られている。しかし、がん発生の初期に体内の正常組織に最初の変異が生じたとき、新たに生じた変異細胞とまわりの正常上皮細胞の境界でいったい何が起こるかについてはほとんど明らかにされていない。近年、当研究室などの研究の進展により、新たに確立した哺乳類培養細胞系を用いて、活性型Ras (RasV12)やv-Src を発現するMDCK細胞が、その周囲を正常MDCK細胞に囲まれると単層上皮細胞層からはじき出される (apical extrusion) 現象が起こることを明らかにしてきた。しかし、どのような分子メカニズムによってお互いの違いを認識し、その結果、変異細胞内の上皮細胞層からの逸脱が起こるのかについては未だあまり明らかになっていない。

Caveolae は細胞膜上に存在するフラスコ型に窪んだ構造をしており、多くのイオンチャネルや受容体が局在することが知られている。そのため、シグナル伝達のプラットフォームとして機能することが近年明らかになってきた。Caveolin-1 (Cav-1)はcaveolae の足場タンパク質として機能する分子として知られており、近年、Cav-1はcaveoleを形成するだけでなく、caveolae に集積する様々な受容体やシグナル蛋白の活性を制御することが知られてきた。また、乳がんや大腸がん、卵巣がん等でCav-1 の発現低下が報告されている。しかし、詳細な機能や作用機序は明らかになっていない。

そこで、本研究では Caveolae および Cav-1 がどのように正常細胞と変異細胞の境界で機能しているのかを明らかにするため、(1) Cav-1 の細胞局在およびノックダウン細胞の apical extrusion に及ぼす効果および (2) Cav-1-binding protein の一つとして同定された EPLIN の Cav-1 への影響、(3) EPLIN が制御する様々な分子メカニズムの解明に関する研究を実施した。

[結果と考察]

(1) Cav-1 の細胞局在およびノックダウン細胞の apical extrusion に及ぼす効果

まず、Cav-1-containing domains の細胞局在の観察および apical extrusion への影響を解析した。Cav-1-containing domains が正常細胞に囲まれた Ras 変異細胞内で apical および lateral 細胞膜に濃縮していることを明らかにした。興味深いことに変異細胞が変異細胞に囲まれたときはこのような濃縮が観察されなかったことから、隣接する正常細胞の存在が変異細胞内の Cav-1-containing domains の濃縮を引き起こしていることが示唆される。また、Cav-1-containing domains を破壊する阻害剤を添加すると Ras 変異細胞の apical extrusion が有意に抑制されることを明らかにした。さらに、Cav-1 ノックダウン Ras 変異細胞を構築し、apical extrusion への影響を調べた

ところ、Cav-1 ノックダウン Ras 変異細胞の apical extrusion は有意に抑制された。以上の結果から、変異細胞内の Cav-1-containing domains は正常細胞に囲まれた変異細胞の運命を制御する因子であると考えられる。

(2) Cav-1-binding protein の一つとして同定された EPLIN の Cav-1 への影響

正常細胞と変異細胞の境界で特異的に Cav-1 と結合する分子を探索するために Cav-1 抗体を用いた免疫沈降を3つの培養条件（正常細胞のみ、正常細胞と Ras 変異細胞の混合培養、Ras 変異細胞のみ）で行なった。その結果、混合培養条件下でのみ特異的に Cav-1 と結合する分子を複数同定した。そのうちのひとつとして、actin 結合タンパク質として知られる Epithelial Lost in Neoplasm (EPLIN)を同定した。そこで、Cav-1 と EPLIN の共局在を免疫染色にて観察した結果、正常細胞に囲まれた変異細胞の細胞膜上で部分的に共局在することを明らかにした。興味深いことに、正常細胞に囲まれた変異細胞内の EPLIN が細胞膜だけでなく細胞質に濃縮することを明らかにした。さらに、EPLIN ノックダウン Ras 変異細胞を構築し、apical extrusion および Cav-1 濃縮への影響を観察したところ、EPLIN ノックダウン Ras 変異細胞の apical extrusion は有意に抑制され、Cav-1 の濃縮局在が乱れることから、EPLIN が Ras 変異細胞の apical extrusion および Cav-1 濃縮を制御する重要な因子であることが示唆された。

(3) EPLIN が制御する様々な分子メカニズムの解明

これまでに、正常細胞に囲まれた変異細胞内で myosin-II および PKA の活性が亢進することが報告されている。そこで、EPLIN がこれら分子の活性に影響を与えているかどうかを明らかにするために、Ras 変異細胞および EPLIN ノックダウン RasV12 変異細胞を用いて myosin-II および PKA の活性を免疫染色で観察した。その結果、EPLIN がノックダウンされると myosin-II および PKA の活性が消失することが明らかになった。また、Cav-1 ノックダウン Ras 変異細胞ではこれら分子の活性に変化が見られなかったことから、EPLIN は Cav-1 非依存的に myosin-II および PKA の活性をポジティブに制御していることが示唆された。さらに、変異細胞と正常細胞の境界で正常細胞内の filamin が集積することがすでに報告されているため、EPLIN あるいは Cav-1 ノックダウン細胞を用いて filamin 集積への影響を観察した。その結果、Ras 変異細胞内の EPLIN または Cav-1 がノックダウンされた時、正常細胞内の変異細胞側への filamin の集積が有意に低下することが明らかになった。さらに、正常細胞内の filamin がノックダウンされた時、Ras 変異細胞内の EPLIN および Cav-1 濃縮がいずれも顕著に抑制されていることを明らかにした。これらの結果は、Ras 変異細胞内の EPLIN-Cav-1 と隣接する正常細胞内の filamin が相互に制御し合うメカニズムが存在することを示唆している(図1)。

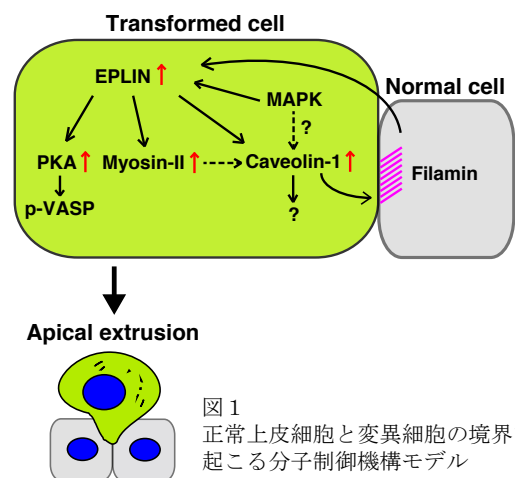


図1
正常上皮細胞と変異細胞の境界で
起こる分子制御機構モデル

【結論】

以上、本研究により、(i) 正常細胞に囲まれた変異細胞内のEPLINが細胞間接着部位だけでなく細胞質にも局在および濃縮すること、(ii) EPLIN がCaveolin-1 の局在を制御していること、(iii) EPLIN がmyosin-II およびPKA の活性をpositive に制御していること、(iv) EPLIN 濃縮が正常細胞内のfilamin の変異細胞側への集積と互いに制御しあうこと、を明らかにした。これらの結果から、EPLIN を介するシグナル伝達経路および隣接する正常細胞との相互作用が正常細胞に囲まれた変異細胞に特異的な副作用のない新しいがん治療薬の開発に繋がるものと期待される。